TaKaRa

PCR 実験の手引き

PCR はごく微量の DNA を出発材料として、高感度の検出を短時間で行うことができる技術です。その応用分野は広く、分子生物学の基盤技術として利用されている他、食品環境分野における遺伝子検査や法医学分野における DNA 鑑定にも応用されつつあり、今後もさらに広範な分野で活用されると期待されます。

PCR の実験操作は決して難しいものではありませんが、PCR で正しい結果を得るためには、その原理や留意点について理解しておく必要があります。本冊子では、PCR の原理や基礎知識とともに、実際に実験を行う際のポイントについて解説します。

目　次

はじめに ・・・・・・・・・・・・・・・ 3

＜理論編＞

１．DNA とは？ ・・・・・・・・・・・・・・・ 4

２．PCR の原理 ・・・・・・・・・・・・・・・ 6

３．PCR 反応について ・・・・・・・・・・・・・・・ 7

４．アガロースゲル電気泳動について ・・・・・・・・・・・・・・・ 9

５．PCR 酵素について ・・・・・・・・・・・・・・・ １４

＜実践編＞

１．PCR 反応系の構築 ・・・・・・・・・・・・・・・ １６

２．PCR 反応 ・・・・・・・・・・・・・・・ １９

３．アガロースゲル電気泳動 ・・・・・・・・・・・・・・・ ２４

４．PCR 結果の判定 ・・・・・・・・・・・・・・・ ２８

５．実験環境の整備 ・・・・・・・・・・・・・・・ ２９

関連製品 ・・・・・・・・・・・・・・・ ３２

はじめに

【PCR とは？】

PCR は、Polymerase Chain Reaction （ポリメラーゼ連鎖反応）の頭文字を取った用語で、ごく微量の DNA を出発材料として、高感度の検出を短時間で行うことができる技術です。この方法を用いることにより、DNA の特定の領域を数時間で 100 万倍に増幅することが可能です。

PCR

Polymerase Chain Reaction

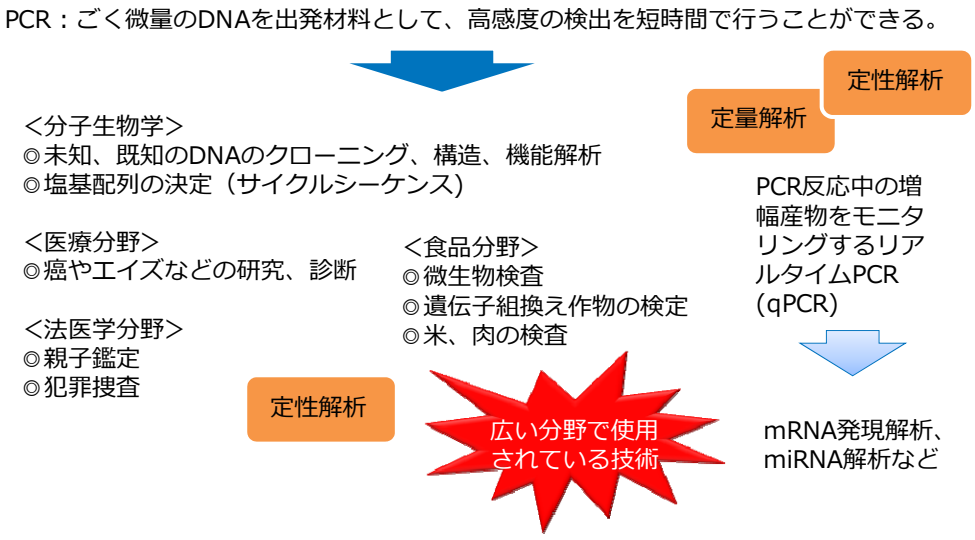
ポリメラーゼ連鎖反応

DNAの特定の領域を数時間で100万倍に増幅する方法

【PCR の用途】

PCR は、汎用性の高い技術であり、さまざまな分野で活用されています。例えば、分子生物学の分野では未知、既知の DNA クローニングや塩基配列の決定(サイクルシーケンス)に使用したり、医療分野で癌やエイズなどの研究、診断、食品分野での微生物検査、遺伝子組み換え作物の検定、米、肉の品種鑑定、法医学分野での親子鑑定、犯罪捜査に用いるなど、多くの例が挙げられます。

また、近年では、PCR 反応中の増幅産物をリアルタイムでモニタリングするリアルタイム PCR が広く使われるようになり、サンプル中に標的となる DNA が存在するかしないかという定性分析の他に、mRNA や miRNA の定量解析も行えるようになっています。



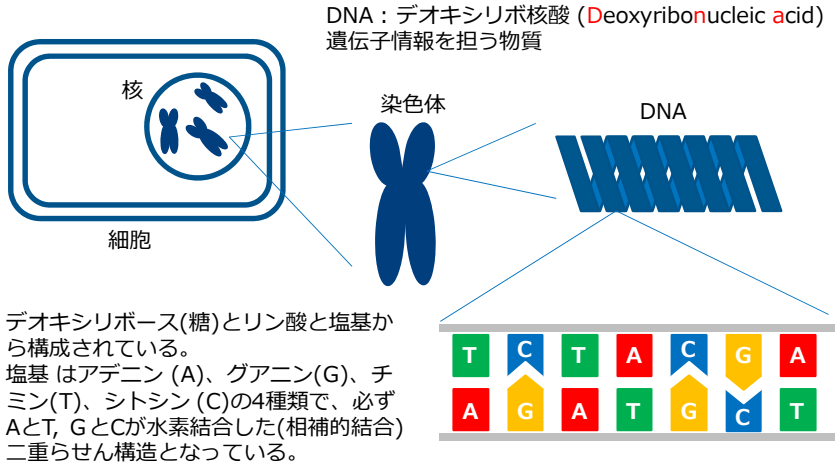
＜理論編＞

1．DNA とは？

【DNA とは？】

DNA（デオキシリボ核酸 Deoxyribonucleic acid）は、遺伝子情報を担う物質です。

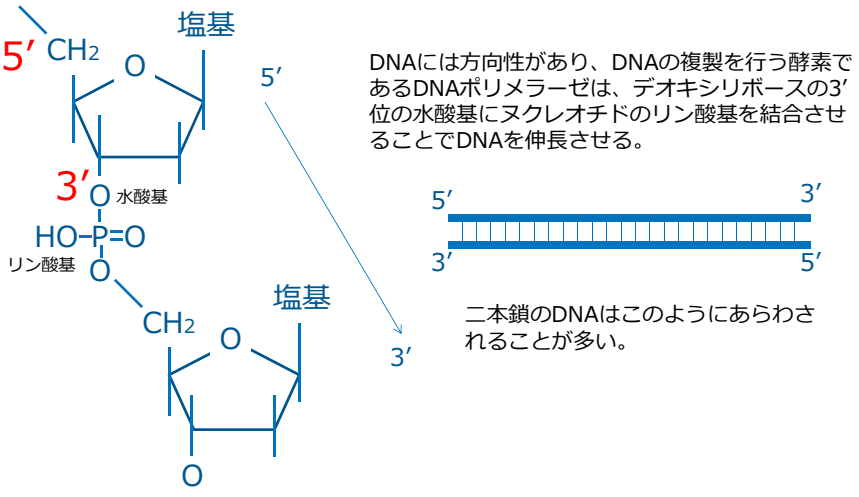
DNA は細胞内の核に存在しています。核の中には染色体があり、その染色体の中に DNA があります。DNA は、デオキシリボースという糖と、リン酸と塩基から構成されており、塩基にはアデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)の 4 つの種類があります。この塩基は下図に示すように A と T、G と C がそれぞれ水素結合した相補的結合をしており、二重らせん構造を取っています。



【DNA の構造と方向性】

DNA は、前述の通りデオキシリボースとリン酸と塩基から構成されており、デオキシリボースの 1’位に塩基が、5’位にリン酸が結合したものがヌクレオチドと呼ばれる DNA の最小単位です。DNA が DNA 合成酵素（DNA ポリメラーゼ）により複製される際には、デオキシリボースの 3’位の水酸基にヌクレオチドのリン酸基を結合させることで DNA を伸長させていきます。すなわち、5’位から 3’位の方向に DNA は伸長していきます。

このように DNA には方向性があり、二本鎖を形成した DNA は、下図のように 5’と 3’の方向性を示した模式図で表されます。

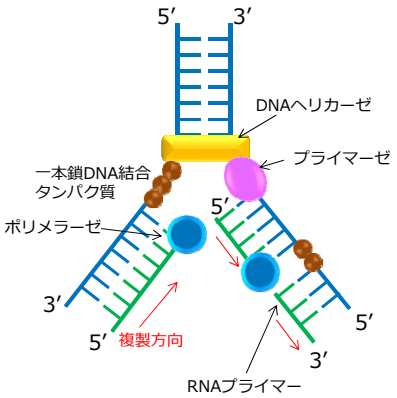


【DNA の合成】

細胞が分裂する際には、DNA が複製することで情報を伝達していきます。PCR はこの DNA 複製の仕組みを利用しています。

DNA 複製の際には、まず DNA ヘリカーゼという酵素によって DNA の二重らせん構造が巻き戻され、一本鎖 DNA 結合タンパク質が結合することにより、一本鎖 DNA が安定化します。次に、プライマーゼという酵素により、プライマーとして働く短い RNA が合成され、このプライマーをとっかかりにして DNA ポリメラーゼという酵素が働き DNA が合成されていきます。

DNA 合成は、片側の鎖の塩基配列に従い、A に対しては T、G に対しては C と、相補的な塩基配列となるように dNTP(デオキシリボヌクレオチド三リン酸)を結合していきます。以上の反応により 1 つの DNA からまったく同じ二つの DNA が合成されます。



DNAの複製とそれに関与するタンパク質

細胞が分裂する際、DNAは”複製”により情報を伝達していく。
PCRはこの仕組みを利用している。

左図のDNA複製においては、

1. DNAヘリカーゼにより、DNAの二重らせん構造の巻き戻し
2. 一本鎖DNA結合タンパク質との結合による一本鎖DNAの安定化
3. プライマーゼにより、プライマーとして働く短鎖のRNAが合成
4. プライマーをとっかかりとしてDNAポリメラーゼが働きDNAが合成
5. DNA合成は、片側の鎖の塩基配列に従い、相補的な塩基配列となるようにdNTPを結合
6. これにより一つのDNAからまったく同じ二つのDNAが合成される。

DNA 複製の過程を PCR に当てはめると、細胞内での DNA ヘリカーゼによる DNA の二重らせん構造の巻き戻し、一本鎖 DNA 結合タンパク質との結合による一本鎖 DNA の安定化の部分は、PCR では熱変性により二本鎖 DNA を一本鎖にし、熱により安定化するステップに対応します。

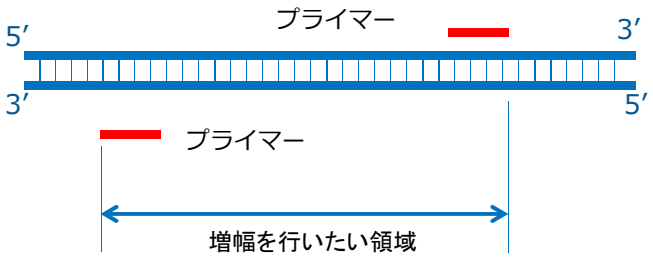
次の、細胞内でのプライマーゼによる短鎖 RNA 合成の部分は、PCR では人工合成した一本鎖 DNA であるプライマーを目的の鋳型 DNA に結合させるステップに対応します。

最後に、細胞内でプライマーをとっかかりとして DNA ポリメラーゼが働き相補的な DNA が合成される部分は、PCR では鋳型 DNA に結合したプライマーから DNA ポリメラーゼによる伸長反応で DNA が合成されるステップに対応します。

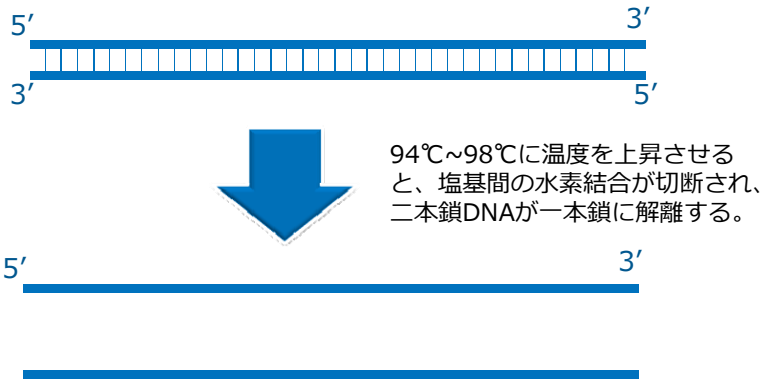
細胞内	PCR
1. DNAヘリカーゼにより、DNAの二重らせん構造の巻き戻し 2. 一本鎖DNA結合タンパク質との結合による一本鎖DNAの安定化	熱変性により二本鎖DNAを一本鎖にし、熱により安定化
3. プライマーゼにより、プライマーとして働く短鎖のRNAが合成	人工合成した一本鎖DNAであるプライマーを、反応液を冷却して目的の鋳型DNAに結合
4. プライマーをとっかかりとしてDNAポリメラーゼが働きDNAが合成 5. DNA合成は、片側の鎖の塩基配列に従い、相補的な塩基配列となるようにdNTPを結合	DNAポリメラーゼにより、鋳型DNAに結合したプライマーの3′末端より伸長反応、鋳型となる一本鎖DNAに相補的な塩基配列が複製。

２．PCR の原理

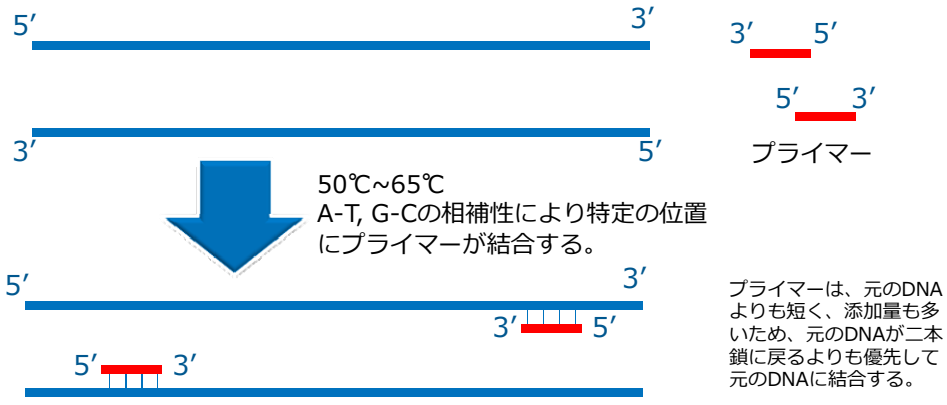
① まず、増幅を行いたい領域を設定し、プライマーを設計します。プライマーは増幅を行いたい領域を挟むようにペアで設計します。



② ステップ 1 では、鋳型となる二本鎖 DNA を熱変性させて一本鎖 DNA に解離させます。DNA は塩基間の水素結合により二本鎖になっていますが、94℃から 98℃に温度を上昇させると、その塩基間の水素結合が切断され、二本鎖 DNA が一本鎖に解離します。

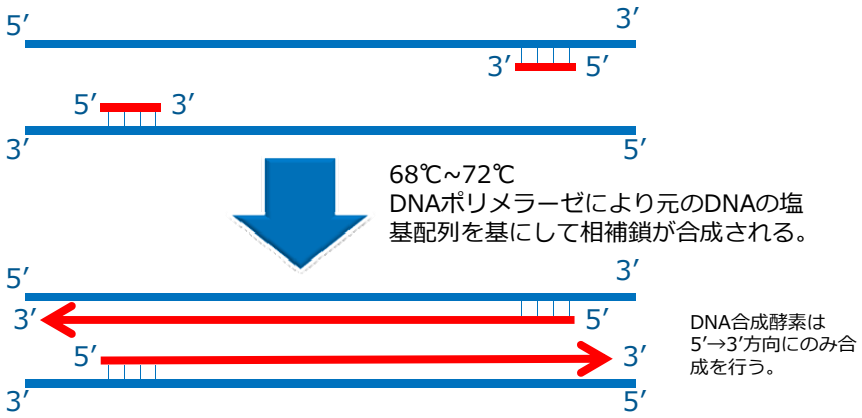


③ ステップ 2 では、一本鎖になった DNA にプライマーを結合させます。温度を 50℃から 65℃に下げると、一本鎖になった DNA は再び二本鎖に戻ろうとしますが、反応液に加えてあるプライマーは、元の DNA よりも短く、量も多いため、元の DNA が二本鎖に戻るよりも優先して鋳型の DNA に結合します。この時、塩基の A-T, G-C の相補性により、特定の位置にプライマーは結合します。

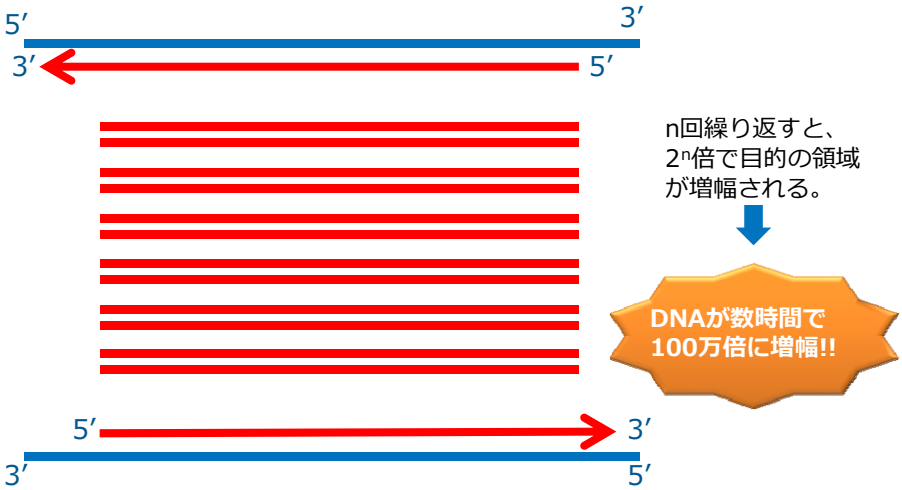


④ ステップ 3 では、DNA ポリメラーゼによって、プライマーから元の DNA の相補鎖が合成されます。

温度を DNA ポリメラーゼの至適温度まで上昇させると、DNA ポリメラーゼによる合成反応が開始されます。



⑤ 以上の３ステップの反応を繰り返し行うことにより理論的には n 回で 2 の n 乗倍に目的の領域が増幅されます。こうして DNA が数時間で 100 万倍に増幅されます。



３．PCR 反応について

１）PCR サイクルの各ステップについて

【熱変性】

通常、サンプルに含まれる鋳型 DNA は二本鎖 DNA であり、そのままでは DNA 伸長反応に用いることはできません。そこで、熱で一本鎖 DNA に解離(変性)してからサイクルを進めます。これが十分でないと増幅効率が低下し、逆に温度が高すぎたり、長すぎたりすると、酵素の失活を早めることになります。ゲノム DNA を鋳型とする場合は、初期熱変性を完全に行うため時間を長めに設定します(95℃, 1～3 分)。なお、サイクル中の熱変性は増幅産物の解離が目的であるため、1～30 秒程度で十分です。

【アニーリング】
変性した鋳型にプライマーが結合するステップです。アニーリング温度はプライマーの配列に依存し、反応の至適化において重要なポイントとなります。温度設定が高かったり、時間が短かったりするとアニーリングが不十分になり増幅効率が低下しますが、温度を低くしすぎると非特異的な増幅が増加します。通常はプライマーの Tm 値±5℃の範囲で設定します。Tm 値（近似値）はプライマーを構成する塩基配列から算出することができます。
※Tm 値 ： 二本鎖 DNA の 50%が解離して一本鎖となる温度

【伸長反応】
使用する耐熱性 DNA ポリメラーゼの性質、反応条件、鋳型 DNA の性質により伸長反応時間を変えます。1kbp あたり 1 分設定というのがよく使われますが、反応性の高い酵素であれば伸長時間を短くすることも可能です。

【サイクル数】
通常は 25 サイクルから 40 サイクルに設定します。サイクルを繰り返すにつれて、DNA ポリメラーゼの活性の低下、反応基質(dNTP, プライマー)の減少、枯渇、反応副産物の蓄積による合成反応の阻害、増幅した DNA 鎖同士の再会合によるプライミング効率の低下、などの原因で反応がそれ以上進まなくなります。また、必要以上のサイクル数の反応を行うと非特異的な増幅を生じる場合があります。

２）PCR に必要な構成物

【プライマー】
鋳型 DNA に相補的な塩基配列を持つ合成オリゴヌクレオチド（短い一本鎖 DNA)。増幅したい領域を挟むように 2 か所に設計します。

【バッファー】
DNA ポリメラーゼが最適な環境で働くことができるよう pH や塩濃度を整えるために使用。メーカーごとに反応特性を改善するための工夫がなされています。

【Mg】
耐熱性 DNA ポリメラーゼが働くために必要となります。キットや酵素に付属している buffer に、適切な濃度となるように加えられています。

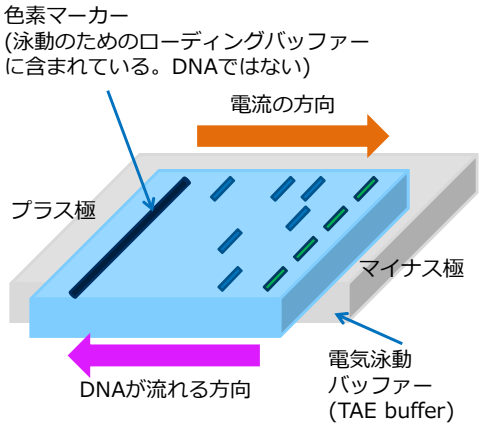
【dNTP (deoxyribonucleotide 5’-triphosphate)】
DNA を合成するために必要な原料。dATP, dGTP, dCTP, dTTP の 4 種類からなる混合物で、キットや酵素に添付されています。あるいは、バッファーや Mg とともに反応用の混合物として適切な濃度で混合されていることもあります。

４．アガロースゲル電気泳動について

１）アガロースゲル電気泳動の原理

寒天の主成分であるアガロースを使用した電気泳動により、核酸（DNA）をその大きさに応じて分離する方法です。PCR が終了したのち、反応産物が目的のものであるかどうかを確認するために行います。

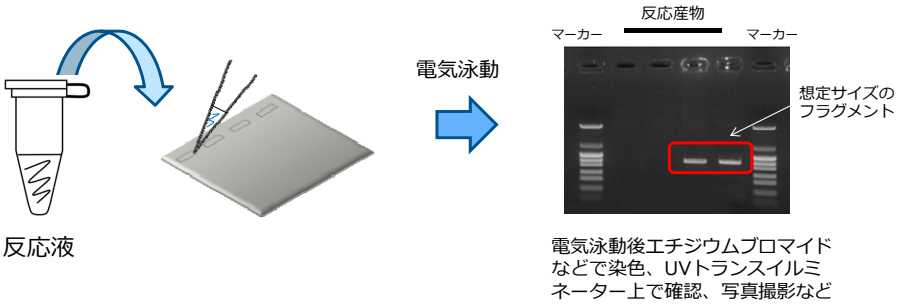
アガロースは二種類の糖が結合しあって網目状の構造をとっており、その網目を DNA が動いていく際に、大きな DNA は網目に引っかかりながら移動するため移動速度が遅く、小さな DNA は網目に引っかかりにくいため移動速度が速いという性質を利用することで、DNA を長さによって分離することができます。DNA は水溶液中ではマイナスの電荷を帯びているため、電場におかれるとプラス極側に移動します。



２）アガロースゲル電気泳動の用途（PCR 増幅産物の確認法）

【PCR 増幅産物のサイズの確認】

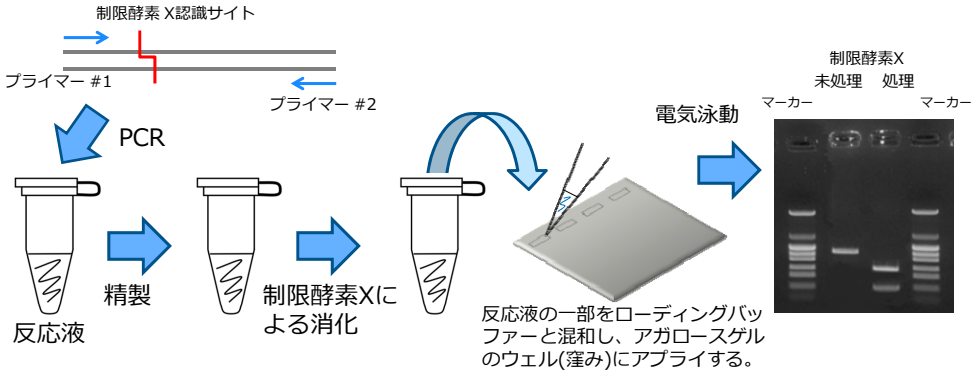
プライマー設計で想定した大きさの増幅断片が得られていることをアガロースゲル電気泳動で確認します。PCR の反応液の一部を泳動の目安となる色素を含み、比重を高めるためのローディングバッファーと混合し、アガロースゲルのウェル（窪み）にアプライします。電気泳動を行った後、エチジウムブロマイドなどで染色を行うと UV トランスイルミネーター上で DNA が確認できますので、写真撮影を行います。増幅断片の大きさは、同時に泳動するサイズマーカーより確認します。



【制限酵素サイトの有無とその位置の確認】

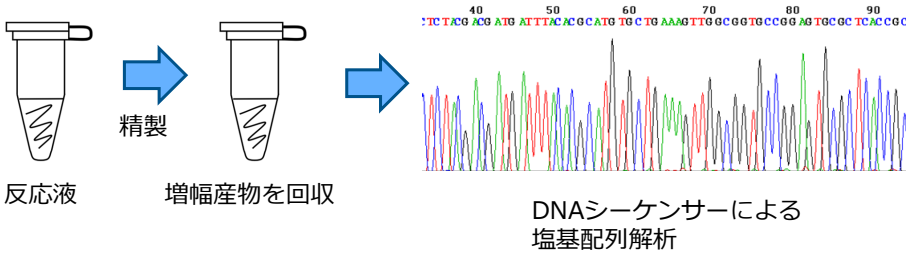
PCR 増幅産物のサイズだけでなく、増幅フラグメントに含まれる制限酵素サイトの有無を確認することで、より確実に目的の増幅断片が得られていることを確認することができます。

PCR 増幅断片中に制限酵素サイトがある場合、それを利用します。以下の模式図では、PCR 増幅産物中に制限酵素 X で認識されるサイトが存在します。PCR の後、反応液を精製し、その制限酵素 X で増幅フラグメントを消化した後、電気泳動を行うと、目的の増幅断片が得られている場合は想定される大きさに切断されたフラグメントが確認されます。



補足：塩基配列の決定

PCR 増幅産物の塩基配列を決定して、目的の産物が得られていることを確認することもできます。増幅産物を精製したのち、PCR に使用したプライマーでシーケンス解析を行うと、増幅産物の塩基配列がわかりますので、その配列より目的の増幅産物であることを確認できます。ただし、非特異増幅があると下図のようなきれいなピークにならず、複数のピークが混在する結果となり、塩基配列は確認できません。



3）アガロースの種類と使い分け

【アガロースゲル作製法による分類】

各種アガロースゲルをバッファーに溶解しゲルメーカーで作製

Agarose L03（製品コード 5003）

Prime Agarose LE 1-20K(製品コード 5800A)

Prime Agarose PCR-Sieve（製品コード 5810A)など

【アガロース用途一覧】

電気泳動用のアガロースとしてさまざまな種類のものが市販されています。PCR 増幅サイズや実験目的に適したものを選択して使用します。例えば、電気泳動後のゲルから DNA を回収する際には、高純度なアガロースを使用します。

		PrimeGel Agarose LE 1-20K	PrimeGel Agarose LE 1-20K GAT	PrimeGel Agarose GOLD 3-40K	PrimeGel Agarose LMT 1-20K	PrimeGel Agarose LMT 1-20K GAT	PrimeGel Agarose PCR-Sieve	PrimeGel Agarose PCR-Sieve HRS	PrimeGel Agarose LMT PCR-Sieve GAT
使用濃度		0.6～2%	0.6～2%	0.3～1.8%	0.75～1.5%	0.75～1.5%	2～5%	1.8～5%	2～5%
核酸分離範囲		200 bp～20 kb	200 bp～20 kb	500 bp～40 kb	200 bp～20 kb	200 bp～20 kb	20 bp～1,500 bp	10～1,200 bp	10～1,500 bp
GAT グレード*1			○			○			○
低融点（LMT）					○	○			○
DNA 回収			○			○			○
ブロッティング		○	○	○			○		
パルスフィールド電気泳動				○					
高移動度		○		○					
高分離能							○	○	
In-Gel 反応	制限酵素処理					○			○
	ライゲーション					○			○
	PCR					○			○
タンパク質泳動									

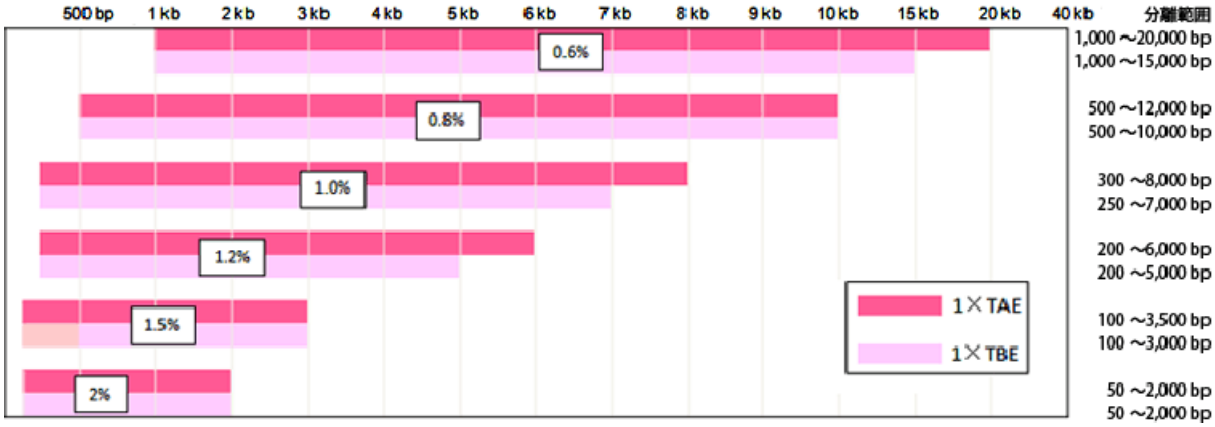
*1 GAT：Genetic Application Tested。遺伝子工学実験用の高品質保証タイプ。

【アガロースの分離能】

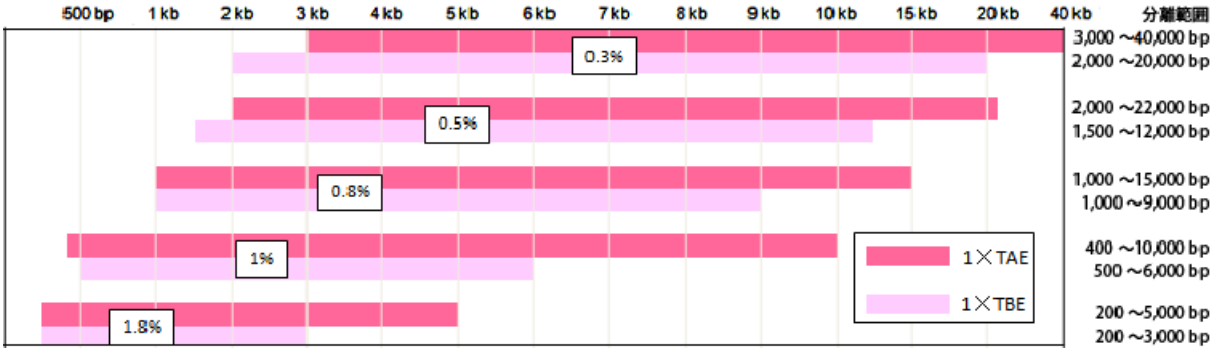
アガロースの種類やゲル濃度によって、DNA サイズの分離能が異なります。目的の PCR 増幅サイズに合ったものを選択して使用します。

1 kb 以上の核酸電気泳動

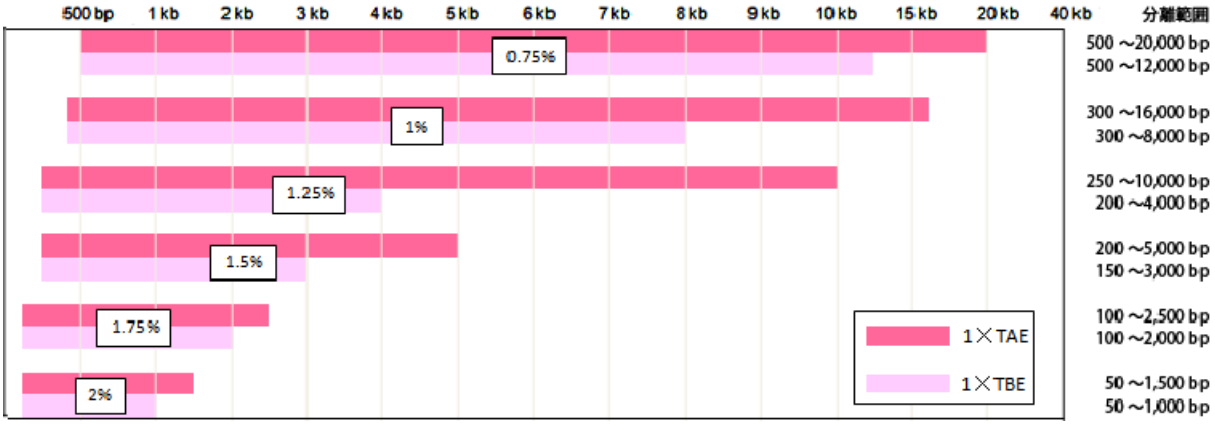
PrimeGel Agarose LE 1-20K、LE 1-20K GAT



PrimeGel Agarose GOLD 3-40K

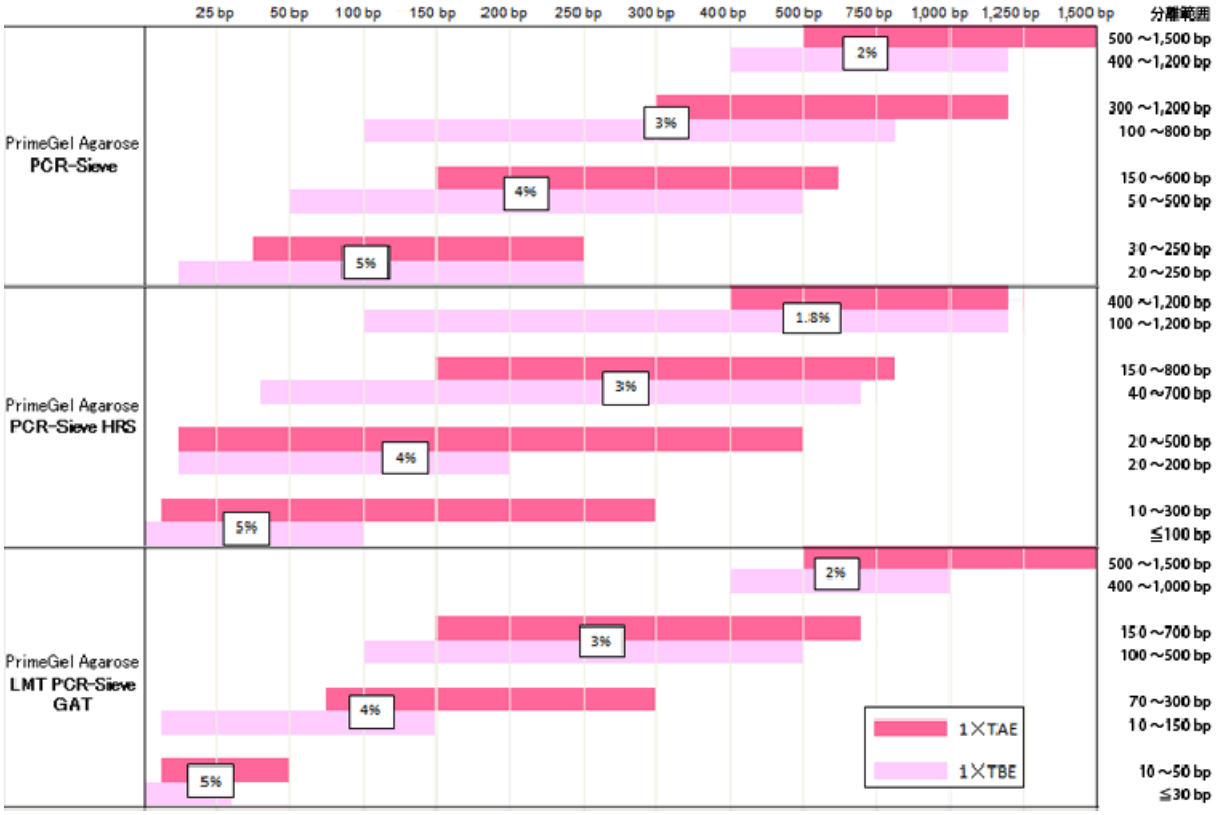


PrimeGel Agarose LMT 1-20K、LMT 1-20K GAT（低融点タイプ）



1 kb 以下の核酸電気泳動

PrimeGel Agarose PCR-Sieve



5．PCR 酵素について

1）Pol I 型とα型

市販の PCR 用の DNA ポリメラーゼは下表のように 2 種に大別されます。

PolI 型の酵素は、高熱性真正細菌由来のもので、5’-3’ exonuclease 活性を持っています。この酵素による PCR 産物は、3’末端に dA を付加する特性があります。製品としては Taq シリーズ、EmeraldAmp などがあります。

α型の酵素は、超高熱性古細菌由来のもので、3’-5’ exonuclease 活性を持っています。この酵素による PCR 産物は、末端は平滑になっています。製品としては PrimeSTAR シリーズ、Tks Gflex などがあります。

3’-5’ exonuclease は、核酸を鎖の 3’末端から 5’末端の方向に加水分解する酵素です。

5’-3’ exonuclease は、核酸を鎖の 5’末端から 3’末端の方向に加水分解する酵素です。

PCR酵素のタイプ	Pol Ⅰ 型(family A)	α型 (family B)
由来	高熱性真正細菌	超高熱性古細菌
3′-5′ exonuclease活性	×	○
5′-3′ exonuclease活性	○	×
増幅産物の3′末端形状	dA付加	平滑
製品例	・Taqシリーズなど	・PrimeSTAR®シリーズ ・Tks Gflex™など

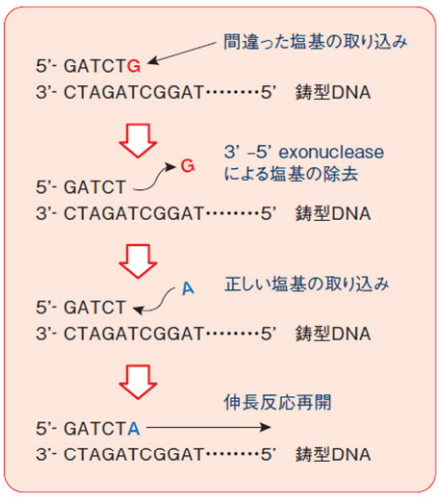
2）α型酵素の校正活性

DNA ポリメラーゼは 5’側から 3’側に DNA を合成していきますが、稀に誤った塩基を取り込むことがあります。3’-5’ exonuclease 活性を有するα型酵素では、その活性によって誤って取り込まれた塩基が削り取られ、正しい塩基が取り込まれて伸長反応が再開されます。従って、α型酵素は、DNA 合成における正確性が 3’-5’ exonuclease 活性を持たない Pol I 型酵素に比べて格段に高いという特性があります。PCR を使用してクローニングを行うといった場合には、α型酵素の使用がお勧めです。

DNAポリメラーゼは、DNAを5′側から3′側に合成するが、稀に誤った塩基が取り込まれることがある。

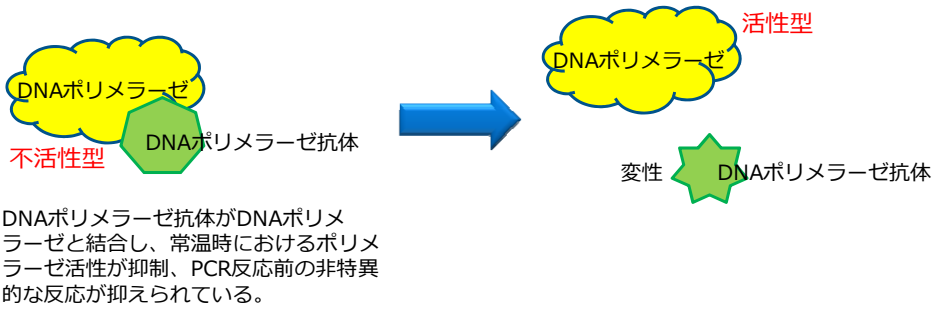
3′-5′ exonuclease活性を有するα型酵素では、誤って取り込まれた塩基が削り取られ、正しい塩基が取り込まれて伸長反応が再開される。

DNA合成における正確性は、3′-5′ exonuclease活性を持たないPol I型酵素に比べて格段に高くなる。



３）Hot Start PCR 法

Hot Start 法とは、PCR において、サイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異増幅を防ぎ、目的断片の増幅効率を高める方法です。この方法では、抗 DNA ポリメラーゼ抗体を結合させたり、化学修飾を行うことで、DNA ポリメラーゼ活性を抑制させた状態の酵素を使用します。この状態では、DNA ポリメラーゼ活性が抑制されていますので、PCR 反応前の非特異的な反応が抑えられており、最初の PCR 反応時に温度が上昇することで、抗体が変性して酵素から外れたり、化学修飾が外れることにより DNA ポリメラーゼの活性が回復し、特異性の高い PCR が進むようになります。



＜実践編＞

1．PCR 反応系の構築

このステップの操作フロー

このステップでは、まず塩基配列情報を入手して、プライマーを設計します。設計したプライマーは、合成後、使用に適した濃度に溶解して保存します。プライマー設計に使用する便利なツールなども併せてご紹介します。

1. 塩基配列情報等の入手
2. プライマーの設計
3. プライマーの合成と保存

1）塩基配列情報の入手

【塩基配列情報の入手方法】

PCR を行う場合は、ターゲットとなる塩基配列情報が必要になります。塩基配列情報が明らかな場合は、その情報を基にして増幅したい領域、プライマーを設計したい範囲を決めます。配列情報が手元にない場合は、GenBank や DDBJ などのデータベース等より周辺配列を含む配列をダウンロードしたり、過去に同様な実験が行われている場合は、論文を入手してその情報を参考にしたりします。

【遺伝子情報データベース】

いくつかの遺伝子情報データベースが公開されており、これらを利用して配列情報を入手することができます。NCBI は、アメリカの国立研究センターが管理するバイオテクノロジーに関する情報を収集したデータベース管理サイトです。通常、遺伝子配列が決定されると、ここに登録されます。

NCBI のデータベースを利用する際には、NCBI の web page にアクセスし、簡易検索バーに目的の遺伝子配列の遺伝子名を入力して検索を行います。

遺伝子情報のデータベースの利用

- **NCBI** http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
  米国の国立研究センターが管理する、バイオテクノロジーに関する情報を収集したデータベース管理サイト

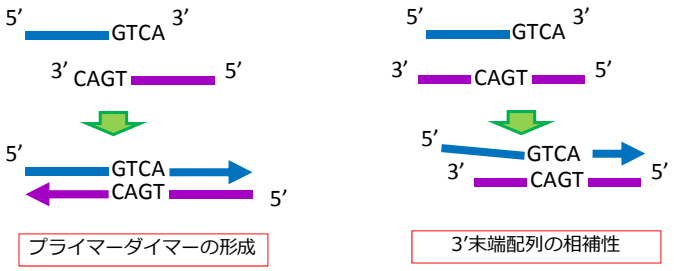
2）プライマー設計

【プライマー設計のポイント】

PCR では、プライマーの設計が非常に大切です。プライマーの配列は、増幅効率や感度、特異性などの反応の成否を決定する重要な要因となるためです。プライマーの設計にあたっては、目的とする場所以外の鋳型 DNA に結合せず、増幅したい鋳型 DNA の配列に効率よく結合することがポイントになります。

【特異性の高いプライマー設計のために】

- プライマーの長さは 20mer 前後に
  mer は重合体を構成する単位分子の数を示す時に使用する表現で、dNTP が 20 個繋がったものという意味です。高速なPCRや長いターゲットを増幅するための場合は長めにすると良いですが、長くしすぎるとアニーリング効率が低下します。
- プライマー3’ 末端の相補性に注意
  プライマー間やプライマー内で 3’ 側に相補性を持たないようにします。プライマー同士でアニーリングをしてプライマーダイマーを形成したりして、目的のターゲットの増幅効率に影響することがあります。



- 3’ 末端の T は避ける
  ミスマッチが起こりやすい傾向があるため、3’ 末端の T は避けます。
- プライマー内の二次構造に注意
  プライマー内で二次構造を取ると、プライマーの利用効率が低下するため、それを避けるようにします。

- GC 含量
  プライマーの GC 含量は 40～60%くらいにします。
- 塩基の偏りに注意
  プライマーを構成する塩基(G, A, T, C)がランダムに分布し、部分的に GC リッチ、AT リッチになるのは避けるようにします。
- Tm 値
  プライマーの Tm 値は 55～60℃くらいになるようにし、ペアとなるプライマーは互いに Tm 値の近いものを選ぶようにします。

【Tm 値】

Tm 値とは melting temperature を意味しており、融解温度と訳されます。DNA においては、二本鎖 DNA の半分が変性し、一本鎖 DNA の状態になる温度のことをいいます。プライマーで得られた値は PCR のアニーリング温度を設定する際の参考になります。

Tm 値の予測値は下記の式で求めることができます。これ以外に nearest neighbor 法を用いると実際の値に近い Tm 値が求められます。ただし、これらの計算値は予測値ですので、実際の Tm 値とは相違があるということは認識しておいてください。

Tm（℃）= 60.8+0.41×(GC %)-(500/n)
Tm（℃）= 4×(G+C)+2×(A+T)+35-2n
GC% ： プライマーの GC 含量（%）
n ： プライマーの長さ
A, G, T, C ： プライマーを構成する各塩基の個数

【プライマー設計ソフトウェア】

プライマー設計には、インシリコモレキュラークローニング （インシリコバイオテクノロジー社）等の市販のプライマーを設計するソフトウェアを利用すると便利です。

◎インシリコモレキュラークローニング(IMC) インシリコバイオロジー社

タカラバイオ株式会社のWeb Page http://www.takara-bio.co.jp/research.htm より

製品情報
↓
解析機器・消耗品・ソフトウェア
↓
インシリコバイオテクノロジー社製品
(一般、アカデミック)

をご参照ください。

http://www.insilicobiology.co.jp

【プライマー設計ツール】

市販のプライマー設計ソフトウェアの他にフリーで使用できるプライマー設計ツールもあります。

◎Primer 3
http://frodo.wi.mit.edu/
DNA 配列から PCR プライマーを設計
◎NCBI Primer-BLAST
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
Primer3 と BLAST を使用して Primer を設計

【特異性の確認】

設計したプライマーについて、プライマーおよびそのプライマーによる増幅領域が標的遺伝子に特異的であることを BLAST 検索で確認します。

BLAST とは Basic Local Alignment Search Tool のことで、DNA の塩基配列あるいはタンパク質のアミノ酸配列のシーケンスアライメントを行うためのアルゴリズムのことです。ある配列についてシーケンスデータベースもしくはライブラリに対して検索することにより、ある閾値以上のスコアで類似するシーケンス群を発見することができます。

3）プライマー合成と保存方法

【プライマーの合成】

プライマー合成は、メーカーに発注します。タカラバイオでも承っておりますので、ご利用下さい。

【プライマーの保存方法】

合成されたプライマーは凍結乾燥品あるいは希望した濃度の溶液状態で納品されます。

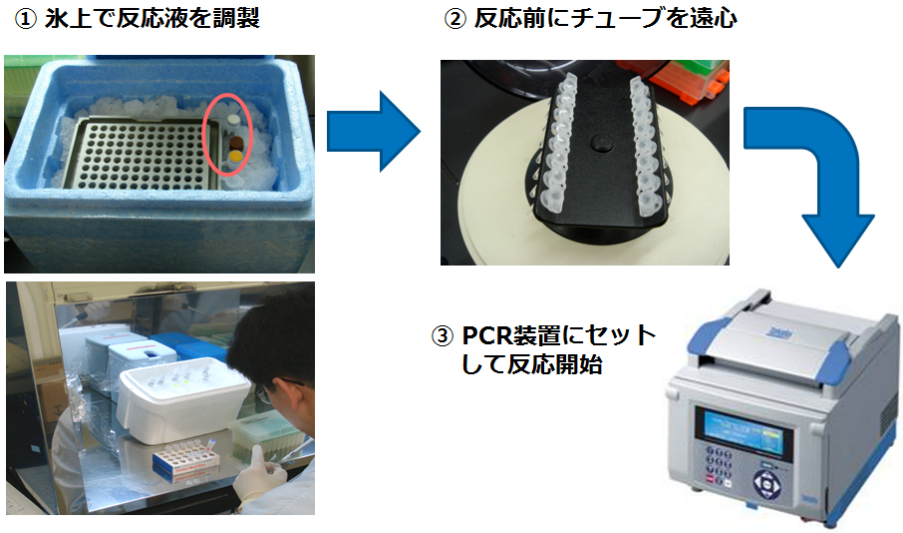
プライマーの溶解や希釈は、DNase の問題をさほど考えないのであれば EDTA を含まない溶液で、DNase の問題を考えるのであれば TE buffer（$TE_{0.1}$ buffer ： 10mM Tris-HCl, pH8.0、0.1mM EDTA）を使用するのが良いでしょう。DNase の活性に必要な金属イオンが EDTA によりトラップされますので、DNase の活性が抑制されます。

合成されたプライマーを適当な濃度に調整する場合は、製品に添付されたデータ(モル数)を参考にします。また保存する場合は、保存用の高濃度溶液と使用濃度の溶液に分けて凍結保存します。

2．PCR 反応

このステップの操作フロー

このステップでは、PCR 反応液を調製して PCR 反応チューブに分注し、PCR 装置にセットして反応を開始します。遺伝子検査で必須となるピペットマンの操作法についても併せて解説します。



1）準備するもの

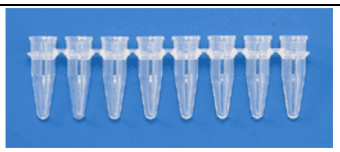
【試薬類】

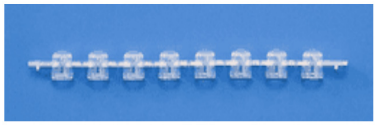
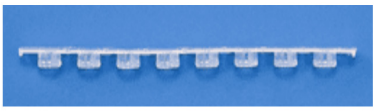
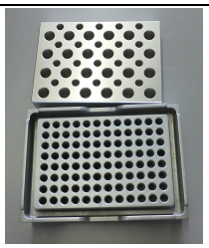
DNA サンプル(鋳型)

プライマー

PCR 試薬

【器具類】

器具名称		用途	
①	マイクロピペット	少量の液体の分取等に使用する器具です。扱う液量に応じて、適切なサイズのものを使用します（20μl用、200μl用、1000μl用等）。	
②	マイクロピペット用チップ	マイクロピペットの先端に取り付けて使用する消耗品です。エアロゾルによるコンタミネーション防止のため、疎水性フィルター付きチップの使用をお勧めします。	
③	1.5 mlチューブ	DNA抽出やPCR反応液の調製等に使用します。 DNase、RNaseフリーの製品または、オートクレーブ滅菌したものを使用します。	
④	0.2 mlチューブ	PCR反応に使用するシングルタイプのチューブです。 DNase、RNaseフリーの製品または、オートクレーブ滅菌したものを使用します。	 0.2 ml Hi-Tube Dome Cap （製品コード NJ200） 0.2 ml Hi-Tube Flat Cap （製品コード NJ202） ※上記製品はオートクレーブ不要です
⑤	0.2 mlチューブ（8連）	PCR反応に使用する8連タイプのチューブです。 DNase、RNaseフリーの製品または、オートクレーブ滅菌したものを使用します。	 0.2 ml Hi-8-Tube （製品コード NJ300）

			 0.2 ml Hi-8-Dome Cap （製品コード NJ301）  0.2 ml Hi-8-Flat Cap （製品コード NJ302） ※上記製品はオートクレーブ不要です
⑥	攪拌機 (Vortex)	試薬の混合等に使用します。	
⑦	パーソナル卓上微量遠心機（1.5 ml用）	反応液をチューブに分注後、チューブ壁などに飛散した反応液をスピンダウンするときに使用します。	
⑧	パーソナル卓上微量遠心機（8連用）	0.2 mlチューブや8連チューブをスピンダウンする際に使用します。	
⑨	アルミラック (1.5 ml用、0.2 ml用)	1.5 mlと0.2 mlのPCRチューブに対応したものがあると、便利です。 氷上にセットして冷却しながら反応液を調製できる金属タイプがお勧めです。	
⑩	アイスボックス	発泡スチロール製などのアイスボックスにクラッシュアイスを入れて使用します。 反応液調製時に試薬や反応液のチューブを立てて冷却し、試薬の劣化を防ぎます。	

⑪	PCR装置	逆転写反応やPCR反応に使用します。	

2）マイクロピペッターの操作

【マイクロピペッターのモデルと推奨使用量】

マイクロピペッターには、容量範囲が異なる複数のモデルがあります。分取する容量に適したものを使用してください。

【マイクロピペッターの操作法】

＊ マイクロピペッターの種類により操作法が異なる場合があります。詳細は、取扱説明書をご参照ください。

① 容量モニターを見ながら、リングを回して容量を設定する。
容量を増やす方向にセットするときは、いったん希望の目盛を越えてから戻して合わせる。

② マイクロピペッターを垂直に持ち、チップラックを片方の手で押さえながら軽くトントンと叩くようにしてチップを固定する。

③ プッシュボタンを最初に止まるところまで押し、この状態を保持したままチップの先端を液体(試料)の中に差し込む。

④ ゆっくりとプッシュボタンを戻し（ばねの力で自然に戻る)、液体(試料)を吸引する。急激に戻さないように注意。

⑤ チップの先端を液体(試料)から静かに引き上げる。
この操作によりチップ内に設定した容量の液体(試料)が保持される。

⑥ チップの先を加えたいチューブや、チューブ内の溶液に浸し、プッシュボタンを最初に止まるところまでゆっくりと押し下げる。

⑦ プッシュボタンをさらにもう一段押し下げ、チップ内の液を完全に吐出する。

⑧ そのままの状態でチップを引き上げたのち、プッシュボタンを元に戻す。

⑨ イジェクターボタンでチップを外して廃棄する。コンタミネーションを避けるため、チップは一回ごとに替える。

【操作の注意点】

① 液量に応じたマイクロピペッターを選択する。
② チップは完全に装着する。
③ 正しい持ち方で使用する。
④ 液を吸い上げるときは、チップを浸す深さに注意する。
⑤ 吸入する際はゆっくりと吸い取る。
⑥ チップの中に液体が入った状態でピペッターを横に傾けたり、さかさまにしない。
⑦ 最大目盛以上、最小目盛以下に設定しない。
⑧ 粘度の高い溶液や、揮発性の高い溶液、微量を測り取る際は、チップ内の液量を目で確認しながら行う。
⑨ 吸排出の際は、チップ内の液面の状態を確認しながら作業する。
⑩ コンタミネーションを避けるため、チップは一回ごとに替えて使用する。
⑪ 正確さを必要とする場合は、マイクロピペッターのバリデーションを行う必要がある。

3）試薬調製

【準備】

PCR 反応液の調製は氷上で行いますので、アイスボックスを用意します。PCR に必要な試薬類は、使用前にフリーザーから取り出して、酵素類はそのまま氷上に立てておきます。バッファーやプライマー等は凍結していますので、室温で溶かし、よく混合してから氷上に立てておきます。すべての試薬は、使用前に小型遠心機で軽くスピンダウンしてください。

【実験エリアについて】

PCR 反応液の調製はエリア 1 で行い、最後の鋳型添加はエリア 3 で行います（「5. 実験環境の整備」参照)。

【反応液の調製】

PCR 反応液は、1 反応分ずつ別々に調製するのではなく、鋳型以外の試薬を含むマスターミックスを必要本数＋α分まとめて調製します。そうすることにより、分取の誤差を小さくし、試薬のロスを防ぐことができます。

エリア 1 で実施

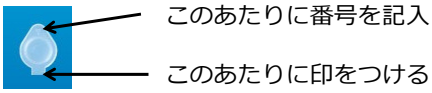
① マスターミックス調製用の 1.5 ml チューブを用意する。

② マスターミックスを調製する。
例えば、以下のように 11 反応分のマスターミックスを調製します。(PCR 組成は、使用する試薬によって異なります。) 試薬を添加する順番は、基本的には容量の大きいものからとし、途中で間違える可能性もありますので、PCR 酵素など高価な試薬は後で添加します。

試薬	1 反応分	11 反応分
滅菌水	33.5 μl	368.5 μl
10X PCR バッファー	5.0 μl	55.0 μl
dNTP Mixture (2.5mM)	4.0 μl	44.0 μl
F-Primer	1.0 μl	11.0 μl
R-Primer	1.0 μl	11.0 μl
PCR 酵素	0.5 μl	5.5 μl
Total	45.0 μl	495 μl

③ マスターミックスを混合する。
マイクロピペッターによる緩やかなピペッティングで混合するか、軽くタッピングして混合します。激しく混合すると、PCR 酵素が失活しますので、攪拌機（ボルテックス）による混合はできません。

④ PCR 用 0.2ml チューブを必要本数用意し、ふたにサンプル名を記入する。
ドーム型キャップのチューブを使用する場合は、ふたの中央に記入すると PCR 反応中に消えてしまうことがあるので、下図の場所に名称や印を記入します。



⑤ PCR 用 0.2ml チューブにマスターミックスを 45μl ずつ分注し、軽くふたをする。

⑥ ネガティブコントロールのチューブに滅菌蒸留水を 5μl 加えふたをする。

エリア 3 で実施

⑦ エリア 3 に移動して、鋳型を 5 μl 加えふたをする。

⑧ チューブ内に溶液が飛散している場合は、卓上遠心機でスピンダウンする。

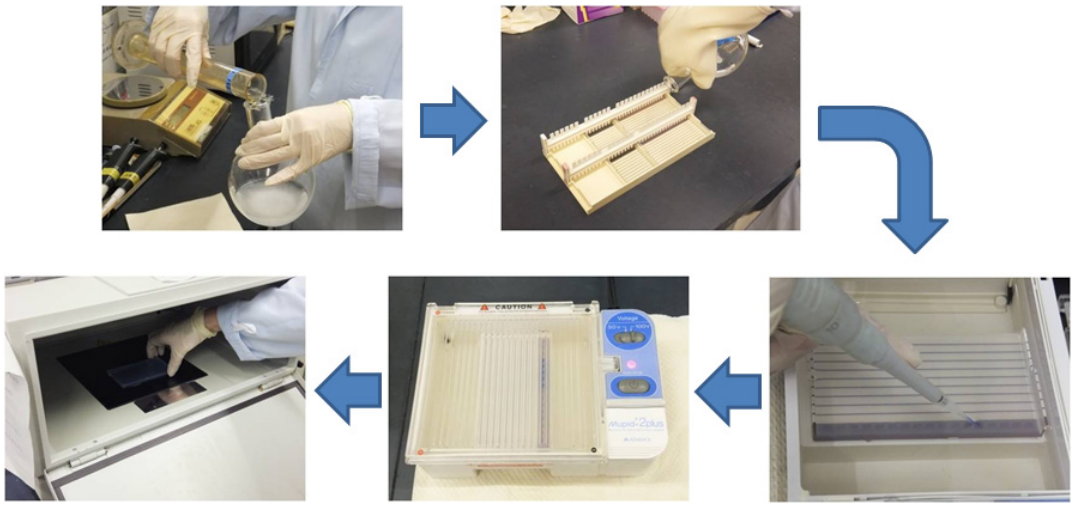
4）PCR 反応

PCR 装置に PCR 条件を入力し、PCR 反応液を調製したチューブをセットして、PCR 反応を開始します。

３．アガロースゲル電気泳動

このステップの操作フロー

このステップでは、まずアガロースゲルを作製し、次に電気泳動を行います。電気泳動後は、エチジウムブロマイド等で DNA を染色して、UV トランスイルミネーター等を用いて DNA を可視化し、写真撮影を行います。



１）準備するもの

① アガロース

② 1×TAE buffer(Tris-Acetate-EDTA buffer)
20 倍濃度、50 倍濃度などで市販されている。
＜調製する場合＞

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	242 g
酢酸	57.1 ml
0.5M EDTA	100 ml

上記をイオン交換水に溶解し、全量を 1L とする（50×濃度）。
使用する際は、イオン交換水で 50 倍に希釈（1×TAE)して使用する。

③ 電子レンジ

④ 平底フラスコ

⑤ エチジウムブロマイド溶液（10mg/ml, Ethidium bromide ; EtBr）
蒸留水に 10 mg/ml となるように溶解する。遮光して保存する。
エチジウムブロマイドは、DNA と結合すると紫外線を照射することにより発光する。これを利用して電気泳動後の DNA を検出するために用いられる。エチジウムブロマイドは変異原性が指摘されているため、取り扱う場合は手袋を使用し、ゲルやエチジウムブロマイドに触れた器具は指定の専用容器に集める。エチジウムブロマイドを含む溶液は使用済み染色液の容器に集め、適宜処理を行う。代替として SYBR 系の色素がある。

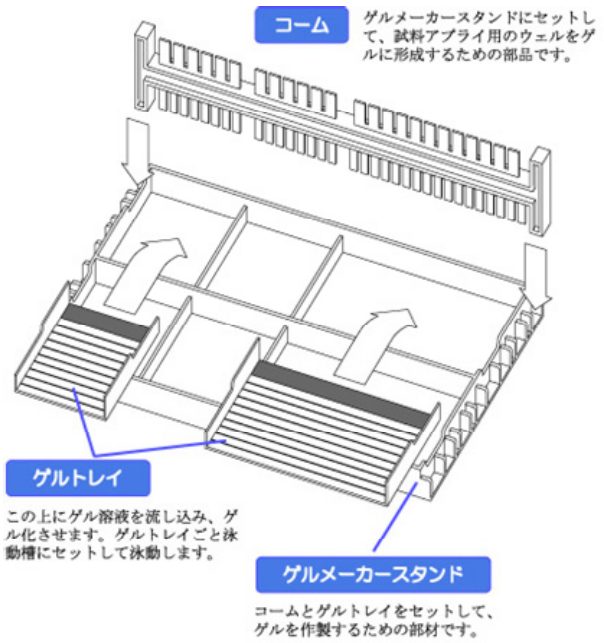
⑥ ゲルメーカー

⑦ サブマリン電気泳動槽

⑧ DNA マーカー

⑨ UV トランスイルミネーター

⑩　泳動写真撮影装置（パワーサプライ）

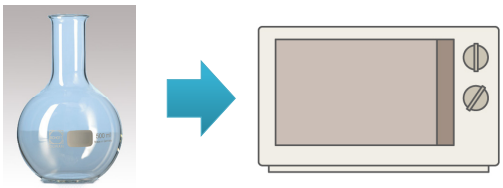


2）アガロースゲルの作製

1% アガロースゲル（160 ml）を作製する場合の手順を以下に示します。

【アガロースの溶解】

① 平底フラスコに 1×TAE バッファーを 160 ml 量り取る。
フラスコは各種あるが、三角フラスコは突沸しやすいため、平底フラスコを用いるとよい。
② 1.6 g のアガロースを加える。
③ アガロースを分散させるため、攪拌してしばらくそのまま置いておく。口にラップを軽くかけておく。
④ 電子レンジで完全に溶かす。
耐熱手袋または軍手をはめ、溶解開始直後は吹きこぼれしやすいので注意する。
⑤ 電子レンジで完全に溶かす。
電子レンジに入れて 20 秒～60 秒ごとに様子を見る。泡が出てきたら加熱を止めてよく攪拌する。これを繰り返し、完全に沸騰するようになったら、1～3 分間沸騰させる。これにより完全にアガロース粒子が水和する。光にかざしてアガロースの粒が完全に見えないことを確認する。（オートクレーブを使用して溶かす方法もある。）
⑥ 加熱終了後、容器を電子レンジより取り出し、室温においてゆっくり冷却する。
⑦ エチジウムブロマイド先染めの場合は、70℃くらいに冷めたところにエチジウムブロマイド溶液を加える（終濃度 0.5 μg/ml）。後染めの場合は何も加えなくてよい。



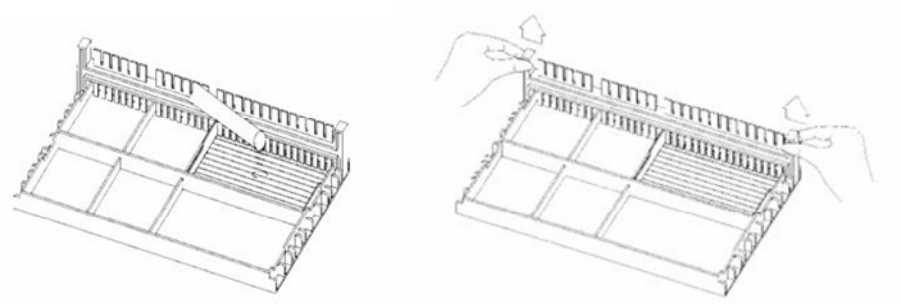
【ゲルメーカーで固化させる】

⑧ ゲルが手で触れるくらいまで冷えたら、ゲルメーカーに流し込む。
ゲルの厚さは 5 mm くらいになるようにし、ゲルメーカー板の高くなっているところを指で押し、ゲルメーカー板の下に回り込んだゲルや空気を押し出す。気泡等がある場合はチップ等で取り除く。コームはあとからセットしてもよい。

⑨ 室温で静置し、ゲルを固化させる。

⑩ ゲルが固まったらコームを注意深く抜く。

⑪ 当日使用しない場合は、コームを外し、ゲルの乾燥を防ぐためにゲルメーカー台ごとラップに包み、冷蔵保存する。また、コーム、板を外したゲルをタッパー等に入れ、泳動バッファーに沈めて保存することもできる。



3）電気泳動

【電気泳動】

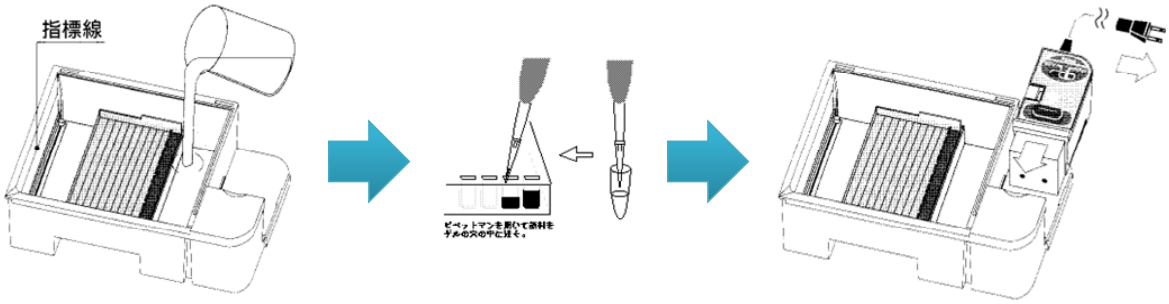
① ゲルをサブマリン電気泳動槽にセットし、1×TAE バッファーをゲルが完全に浸る程度に満たす。

② 先染めのゲルの場合は、エチジウムブロマイドを泳動バッファーに添加しておく。(エチジウムブロマイドはプラス極側からマイナス極側に移動するので、プラス極側に多めに加えておくとよい)

③ 電極を泳動槽に取り付ける。この時 DNA はプラス極に向かって流れていくので、プラス極とマイナス極の方向を間違えないようにする。

④ 泳動したい DNA 溶液とローディングバッファーを混合し、ゲルのウェル(ゲルを作製した際、コームで付けたへこんだ穴)にアプライする。

⑤ 電源ボタンを押して泳動を開始する。



【バンドの可視化と写真撮影】

① 先染の場合

泳動終了後、そのままをトランスイルミネーターに載せ、UV を照射する。DNA のバンド像が確認されるので、その状態を写真撮影する。(写真撮影する場合は、フィルターを付けて撮影する)

② 後染めの場合

1×TAE バッファーで 0.5 μg/ml となるように希釈したエチジウムブロマイド溶液(あるいは、1×TAE バッファーで希釈した SYBR Green I 溶液)を用意し、そこに泳動の終わったゲルを入れる。ゆっくり 15 分くらい振とうして染色を行い、その後トランスイルミネーターに載せ、UV を照射する。DNA のバンド像が確認されるので、その状態を写真撮影する。(写真撮影する場合は、フィルターを付けて撮影する)

【色素の移動度】

PCR 反応液をゲルにアプライする際に混和するローディングバッファー中には、泳動の目安となる色素として、BPB(ブロモフェノールブルー)や XC(キシレンシアノール)などが含まれている。

各濃度アガロースゲルにおける移動度(bp)

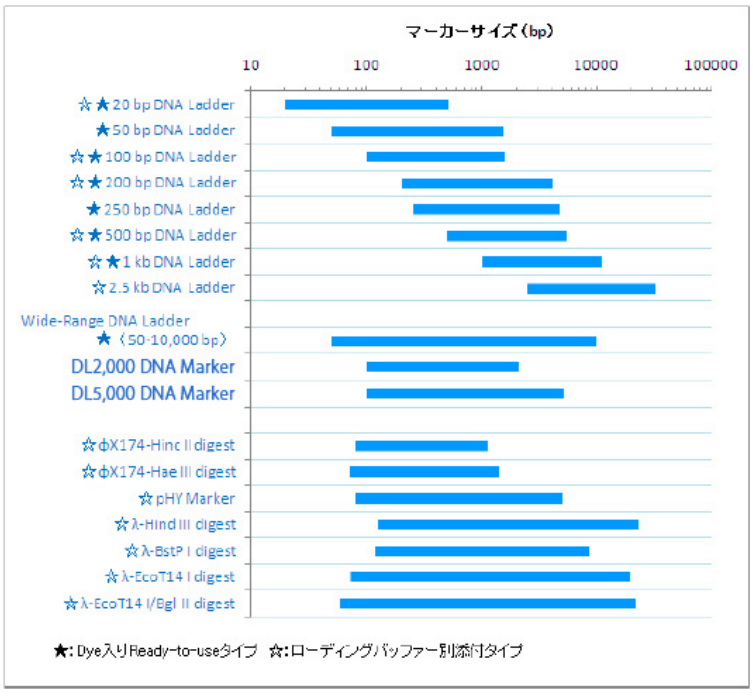
L03,H14 Prime Agarose LE 1-20K(XC)		
0.50%	1%	2%
15,000	5,000	2,600

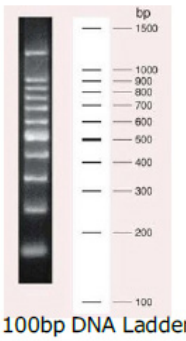
Prime Agarose PCR-Sieve(XC)		
3%	4%	5%
500	250	200

L03,H14 Prime Agarose LE 1-20K(BPB)		
0.50%	1%	2%
1,800	650	200

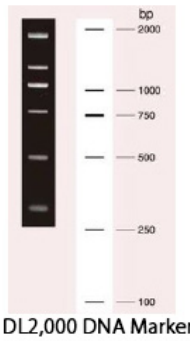
Prime Agarose PCR-Sieve(BPB)		
3%	4%	5%
80	40	25

【DNA 分子量マーカー早見表】

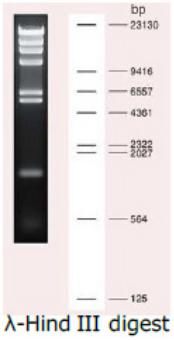




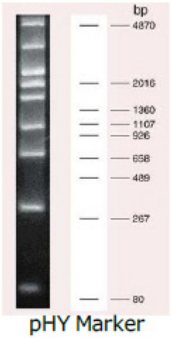
100bp DNA Ladder



DL2,000 DNA Marker



λ-Hind III digest

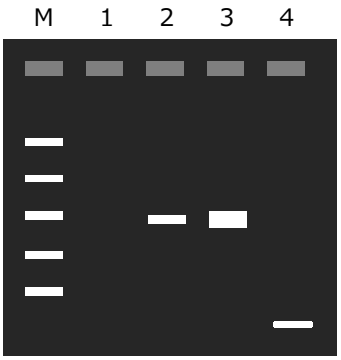


pHY Marker

４．PCR 結果の判定

１）結果の判定

電気泳動の結果が得られたら PCR 増幅産物の有無と増幅サイズを確認します。PCR 増幅産物のバンドが検出されても、目的のサイズと異なる場合は、陰性の判定となります。また、バンドの濃さは PCR 増幅産物の量を反映していますので、ある程度、初期鋳型量の指標となります。



M	サイズマーカー
1	反応液1のPCR産物
2	反応液2のPCR産物
3	反応液3のPCR産物
4	反応液4のPCR産物

1. 増幅産物が得られていない。
2. 想定されるサイズの増幅産物が得られている
3. 同上
4. 増幅産物は得られているが、想定されるサイズの増幅産物ではない

２）反応条件の至適化

電気泳動の結果、目的の増幅産物が得られていなかったり、非特異的な増幅が多かった場合には、反応条件の至適化を行います。至適化を行うことにより、目的の増幅産物量の増加、非特異的増幅の低減、時間の短縮、サンプル、酵素等の節約によるコスト低減などが期待できます。

	増幅が認められない場合	非特異的増幅が認められる場合
鋳型DNA量	増やす、あるは減らす	減らす
アニーリング時間	長くする	短くする
アンーリング温度	下げる	上げる
サイクル数	増やす	減らす
伸長反応時間	長くする	短くする
プライマー量	増やす	減らす
プライマーの再設計	効果あり	効果あり
Hot Start	効果あり	効果あり

５．実験環境の整備

１）コンタミネーションの原因

PCR は非常に高感度な検出法であるため、混入したのが微量の DNA であったとしても、それが増幅され判定結果に大きな影響を及ぼすことがあり、コンタミネーションに十分注意する必要があります。

【DNA が混入するケース】

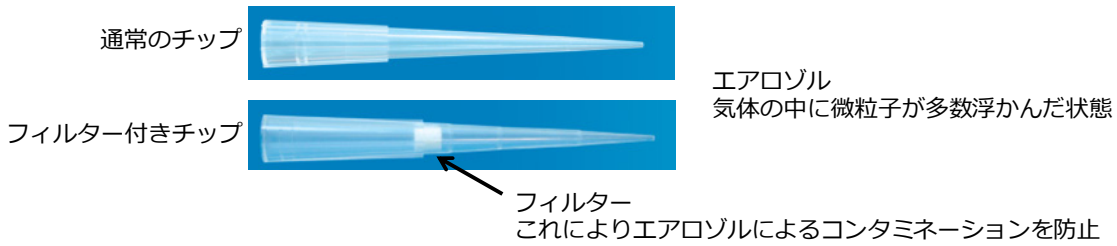
① 外から入り込む DNA（ヒトの皮膚、髪の毛、微生物(常在菌)）
② 抽出した DNA サンプル間のクロスコンタミネーション
③ 前回行った PCR 等の DNA 実験で残存している DNA（増幅産物等）

【混入した DNA の由来】

① 実験台、ピペッター、チップ、チューブ立てなど、日常で使用する器具
② 使用する試薬、酵素
③ サンプル DNA 溶液

２）コンタミネーションの防止対策

① PCR のサンプル調製時、反応液調製時はグローブをつけて操作する。
② ピペッターからの混入を防ぐため、エアロゾル防止チップを用いる。



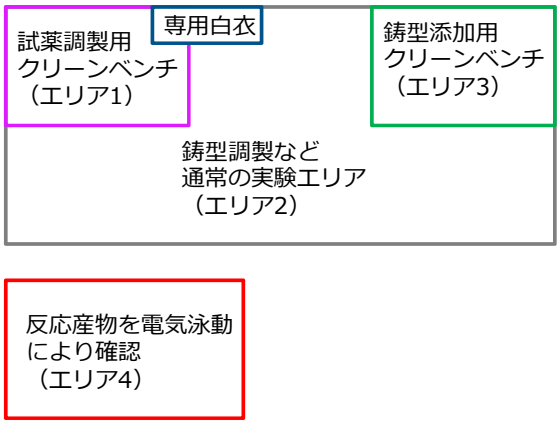
③ 溶液の入ったチューブ類は、開ける前に簡単に遠心する。
④ チューブのふたを開けるときは、内ぶた等に触れないように、また飛沫が発生しないように注意する。
⑤ 反応液調製の際は、サンプル DNA をいちばん最後に加える。
⑥ PCR 反応液調製、検体からの鋳型 DNA 調製、PCR 反応液への鋳型の添加、電気泳動のための場所をそれぞれ別にし、機器、器具等も部屋ごとに用意する。実験設備内で試料の流れを一方通行にすることで、反応液への増幅産物の混入を防ぐことができる。

☆エリア 1☆
反応液の調製、分注を行うエリア。増幅産物や検体の入ったチューブの開閉は避ける。

☆エリア 2☆
検体の調製を行うエリア。増幅産物の入ったチューブの開閉は避ける。

☆エリア 3☆
反応液への検体の添加と反応を行うエリア。

☆エリア 4☆
反応産物を解析するエリア。解析のために持ち込んだ増幅産物の入ったチューブは持ち出さないようにする。



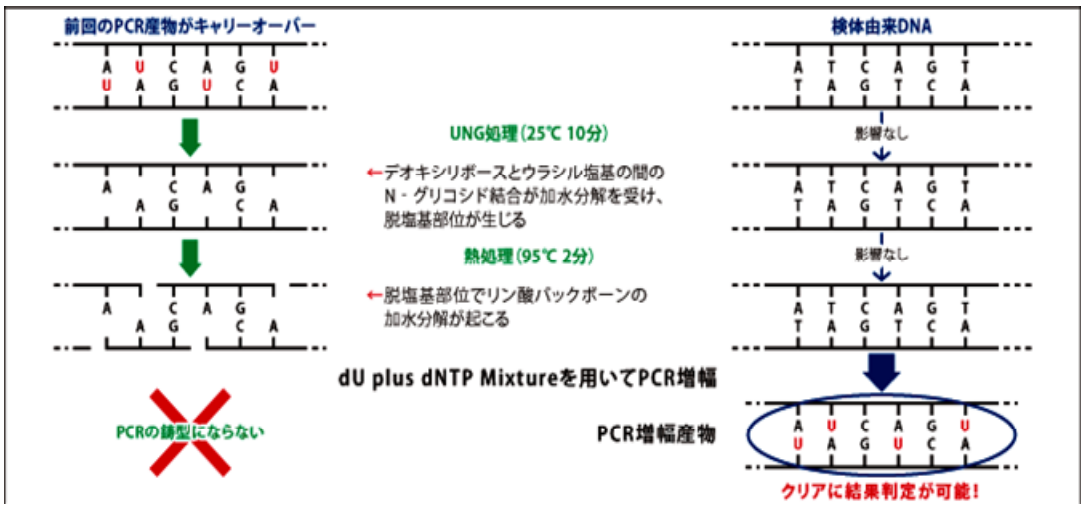
1～3 のエリアは、別々の実験室を設けることができれば理想的ですが、上図のように一部屋の中にクリーンベンチを設置してエリア分けすることも可能です。エリア 4 は、必ずエリア 1～3 とは別の実験室にしてください。

各エリアで使用するマイクロピペットやチップ、白衣や手袋は、エリア専用とし、共通での使用を避けてください。特にエリア 1 には、鋳型となる DNA が存在することのないよう、細心の注意を払います。

⑦ 必ずポジティブコントロール、ネガティブコントロールを用意し、反応を行う。これにより、毎回の PCR の評価を行うことができ、コンタミネーションやその他の異常に気が付き、時間や費用のロスを少なくすることができる。

⑧ Uracil - N - glycosylase(UNG)の使用

使用可能な酵素は限られるが、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit(code：6088)などを使用することで、以前行った PCR 増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性を抑制することができる。



dTTP の代わりに dUTP を含む基質を用いて PCR を行い、増幅産物にウラシル塩基を取り込ませる。

↓

この増幅産物のキャリーオーバーに対して UNG 処理して PCR を行うことで、キャリーオーバーした増幅産物は分解され、鋳型とはならず、ウラシルを含まない検体由来の DNA のみが鋳型と

なる。

【コンタミネーションが発生したら】

万が一、コンタミネーションが発生した場合は、考えられる原因にひとつひとつ対処してください。試薬へのコンタミネーションが疑われるときは、新しいものに取り替える必要があります。実験台や器具類は十分洗浄をして滅菌を徹底するようにしてください。

関連製品一覧

■PCR 装置

製品名	用途	製品コード	容量	価格
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch*	A4 サイズに収まるコンパクトな PCR 装置（グラジェント機能付き）	TP350	一式	¥638,000
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient	グラジェント機能付き 96 ウェルプレート対応 PCR 装置	TP600	一式	¥858,000
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Standard	96 ウェルプレート対応 PCR 装置	TP650	一式	¥748,000
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® mini	24 ウェル対応パーソナルタイプの PCR 装置	TP100	一式	¥528,000

■PCR 装置関連製品（消耗品）

製品名	用途	製品コード	容量	価格
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap	2 ml チューブドーム型キャップ	NJ200	1,000 本	¥9,350
0.2 ml Hi-Tube Flat Cap	2 ml チューブフラット型キャップ	NJ202	1,000 本	¥9,350
0.2 ml Hi-8-Tube	8 連チューブ	NJ300	125 strips	¥16,500
0.2 ml Hi-8-Dome Cap	8 連チューブドーム型キャップ	NJ301	125 strips	¥4,400
0.2 ml Hi-8-Flat Cap	8 連チューブフラット型キャップ	NJ302	125 strips	¥4,400
TaKaRa 96 well PCR Hi-Plate	96 ウェルプレート	NJ111	50 枚（8 連×12/枚）	¥40,700
TaKaRa PCR Hi-Caps（8 連）	96 ウェルプレート用キャップ	NJ811	120 本	¥6,050

■電気泳動装置

製品名	用途	製品コード	容量	価格
Mupid®-2plus	サブマリン型の電気泳動装置	M-2P	一式	¥40,760

■アガロースゲル

製品名	ターゲット	製品コード	容量	価格
Agarose LO3 「TAKARA」	1,000 bp 以上の DNA の分離、解析に適したアガロース	5003	100g	¥17,000
		5003B	500g	¥78,000
PrimeGel™ Agarose LE 1-20K	200 bp～20,000 bp までの広範囲なサイズの DNA の分離とブロッティングに適した、ルーチン利用のアガロース	5800A	100g	¥24,000
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve	TAE Buffer 中では 3%ゲル濃度で 300～1,200 bp、TBE Buffer 中では 3%ゲル濃度で 100～800 bp の DNA を分離することができる	5810A	100g	¥48,000

■キャリーオーバー防止関連製品

製品名	用途	製品コード	容量	価格
TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit	以前に行った PCR 増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止	6088	200 回	¥46,000

【ライセンスについて】

[L18] Gradient Thermocycler ：This product(Model #TP600) is licensed under U.S. Patent Nos. 5,525,300; 5,779,981; 6,054,263; 6,962,821, and corresponding foreign counterparts thereto.

その他のライセンス（最新のライセンス情報）に関しては弊社ウェブサイトにてご確認下さい。

●本冊子で紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
●タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
●本冊子の内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することはご遠慮ください。
●本冊子に記載されている社名および製品名は、特に記載なくても各社の商標または登録商標です。
●本冊子記載の価格は2014年10月20日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

TaKaRa テクニカルサポートライン

TEL. 077-543-6116 FAX. 077-543-1977
東京支店 TEL. 03-3271-8553 FAX. 03-3271-7282
関西支店 TEL. 077-565-6969 FAX. 077-565-6995